

④日本国特許庁  
公開特許公報

⑤特許出願公開  
昭52-154595

⑥Int. Cl.  
C 12 D 13/00

識別記号  
1 4 5

⑦日本分類 庁内整理番号  
38(2) D 531.42 7048-49

⑧公開 昭和52年(1977)12月22日

発明の数 1  
審査請求 未請求

(全 3 頁)

④発酵法によるイノシンの製造法

⑥特 願 昭51-70518  
⑥出 願 昭51(1976)6月16日  
⑥発 明 者 江井仁  
同 返子市池子2-30-2  
松井裕  
川崎市幸区鹿島田958

⑦発 明 者 佐藤勝明  
同 横須賀市馬堀海岸1-1  
滝波弘一  
横浜市港北区篠原台町3-16-10  
⑧出 願 人 味の素株式会社  
東京都中央区京橋1丁目6番地

明 細 書

- 1 発明の名称 発酵法によるイノシンの製造法
- 2 特許請求の範囲

バチルス属に属し、アデニンを要求し、菌株に比べより強い5'-ヌクレオチダーゼ(5135)活性を有し、かつイノシン生産能を有する変異株を培養し、培養中に生成蓄積したイノシンを採取することを特徴とする発酵法によるイノシンの製造法。

- 3 発明の詳細な説明

この発明は発酵法によるイノシンの製造法に関する。

従来イノシンはバチルス属の変異株を用いて製造されている。本発明者らに従来の製造法を更に改良すべく検討した結果、従来のバチルス属のイノシン生産能を有する変異株に、更に菌株よりより強い5'-ヌクレオチダーゼ(5135)活性を付与したような変異株が、より高い収率でイノシンを生産することを知った。

即ち、この発明は、バチルス属に属し、アデニンを要求し、菌株に比べより強い5'-ヌクレオチダーゼ活性を有し、かつイノシン生産能を有する変異株を培養し、培養中に生成蓄積したイノシンを採取することを特徴とする発酵法によるイノシンの製造法である。

本発明の方法において用いる微生物は上記のような性質を有するものであるが、このような微生物は通常の方法により菌株より変異誘導できる。5'-ヌクレオチダーゼ活性の高い変異株のスクリーニングは、5'-ヌクレオチドを基質として、培養の適温程度の高い菌株を選択することにより容易になし得る。

また本発明の変異株に、更に従来イノシン生産を増加することが知られている性質、例えばアミノ酸要求性、プリンアナログ耐性、5'-グアニルレダクターゼ欠損等性質を更に付与すればより生産能の高い変異株が得られる。

本発明の変異株を誘導する際に用いる菌株としては従来イノシンを生産することが知られて

いる、バチルス・ズブテリス、バチルス・ブイ  
ルス、バチルス・リクニフォルミス等があげら  
れる。

次にこのような微生物を従属培養した具体的  
な一例を示す。

#### 実験例

バチルス・ズブテリス AJ 11045 (FERM-P  
5587) を N-メチル-N'-エトロー-N-エト  
ロアミン (1000 mg/l) にて 0℃ で 40 分間  
処理し、ついで紫外線を 1 分間照射した。これ  
を、下記培地に希釈し、生じたコロニーに 5 mM  
の N-エトローアミン溶液を添加し、黄  
色コロニーを大きく生じた菌株を採取した。この  
ようにして得られたアルカリホスファターゼ活  
性の低い菌株の中からさらに 5'-IMP を基質と  
して細胞培養の細胞速度を測定し (ヘッペルら  
の方法)、5'-ヌクレオチダーゼ活性を測定し  
た。かくして、イノシン生産能の高い AJ 11045  
(FERM-P 5587) を得た。

上記と同様な方法により AJ 11046 (FERM-P

5590) より 5'-ヌクレオチダーゼの強い菌株  
株 AJ 11046 (FERM-P 5588) を得た。

#### 培地:

トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン	3 g/l
NaCl	5 g/l
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.25 g/l
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.015 g/l
グルコース	2 g/l
ペプトン	2 g/l
アデニン	0.1 g/l

(pH 8.0)

かくして選択された本発明の菌株の 5'-ヌ  
クレオチダーゼの菌株に対する比活性は第 1 図  
に示す通りである。

第 1 図

株	性質	5'-ヌクレオ チダーゼの 比活性
バチルス・ズブテリス		
AJ 11045 (FERM-P 5589)	Ado Arg, 5'-UMP-レダクター ゼ欠損	100
AJ 11045 (FERM-P 5587)	Ado Arg, 5'-UMP-レダクター ゼ欠損, 5'-ヌクレオチダーゼ強	550
AJ 11046 (FERM-P 5590)	Ado Arg, 5'-UMP-レダクター ゼ欠損, 8-アザグアニン耐性	100
AJ 11046 (FERM-P 5588)	Ado Arg, 5'-UMP-レダクター ゼ欠損, 8-アザグアニン耐性 5'-ヌクレオチダーゼ強	550

微生物の培養に用いる培地は、炭素源、窒素  
源、無機イオン、アデニンおよびその他の被吸  
収物質、その他必要に応じて適当な有機微量元  
素を含有する通常の培地である。

炭素源としては、グルコース、シュクロース  
等の炭水化物、エタノール、グリセリン、ソル  
ビトール等のアルコール、酢酸等の有機酸が適

宜使用できる。窒素源としてはアンモニウム塩、  
アンモニア水、アンモニアガス等が用いられる。

培養の条件としては、好気的條件がよく、発  
酵温度は 25℃ - 40℃、培養日数は通常 2 -  
5 日である。場合によっては培養途中で培養温  
度を若干変化させる事もよい。培養開始時およ  
び培養中の pH は 5.0 - 8.0 がよく pH の調整は  
無機酸または有機酸またはアルカリ性物質、炭酸カ  
ルシウム、アンモニアガス、アンモニア水、炭  
素などを使用することができる。

培養液よりイノシンを採取するには、菌体を  
分離除去し、その上清をイオン交換樹脂処理し  
たのち、イノシン区分を集め濃縮し有機溶媒を  
加える。この操作で析出するイノシンを水又は  
有機溶媒 (80% EtOH) から再結する。この操  
作によって得られた精製結晶は元素分析、リガース  
の反応、紫外線吸収曲線、赤外線吸収曲線より  
純品の 9-アノシンと一致した。

## 実施例 1

## シード増地

グルコース

6 g/dl

 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 

0.5 g/dl

 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 

2.05 g/dl

 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 

0.04 g/dl

大豆蛋白加水分解液

4 ml/dl

酵母抽出液

0.5 g/dl

キサンチン

5 mg/dl

 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 

1 mg/dl

 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 

1 mg/dl

pH 2.4

(KOH)

## 発酵増地

グルコース

8 g/dl

 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 

1.5 g/dl

 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 

0.05 g/dl

 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 

0.04 g/dl

 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 

1 mg/dl

 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 

1 mg/dl

KOL

特開852-154595(3)

2.1 g/dl

リボ核酸

0.1 g/dl

キサンチン

5 mg/dl

DL-メチオニン

0.03 g/dl

大豆蛋白加水分解液

3.2 ml/dl

 $\text{CaCO}_3$  (別添) )

2 g/dl

pH

7.0 (KOH)

上記シード増地 50 ml を 500 ml 容量瓶 フラスコに懸込み、第 2 表に示す微生物を接種して 34℃にて 16 時間振盪培養した。

一方上生発酵増地 20 ml を 500 ml 容量瓶 フラスコに入れ、上記増地培養液 1 ml を接種し、34℃にて 72 時間振盪培養した。

培養液中のイノシンをペーパークロマトグラフ法により分離した後、0.1 M HCl で抽出し、280 nm の吸光度を測定したところ 2.0 g/dl のイノシンが生産された。

上記と同様な方法により AJ 11044 の培養液 1 ml を調製し、菌体を除去しその濾液を常法に

とリオン交換樹脂にて処理した後、イノシン区分を蒸留濃縮した。粗イノシン結晶を得て再結晶、精製し、結晶 1.2 g を得た。

菌株	イノシン 濃度 (g/dl)
バチルス・スプタリクス	
AJ 11045 (FERM-P5589)	1.5
AJ 11048 (FERM-P5587)	1.9
AJ 11046 (FERM-P5590)	1.4
AJ 11044 (FERM-P5586)	2.0

特許出願人 味の素株式会社